

· 论 著 ·

类固醇受体辅活化子-3 在急性胰腺炎患者外周血中的表达及意义

李 佳¹, 李 莹², 尹扬光¹, 史 忠^{1△}

(第三军医大学新桥医院:1. 急救部;2. 心内科, 重庆 400037)

摘要:目的 探讨类固醇受体辅活化子-3(SRC-3)在急性胰腺炎(AP)患者外周血中的表达及意义。方法 采用 RT-PCR 和 Western blot 技术分别测定在重症急性胰腺炎(SAP)组、轻症急性胰腺炎(MAP)组和正常对照(NC)组患者外周血中的 SRC-3 mRNA 转录情况和蛋白表达水平。结果 SRC-3 mRNA 及蛋白在 SAP 组、MAP 组和 NC 组患者外周血中的表达存在差异,其表达水平依次降低($P < 0.01$)。结论 SRC-3 的表达与 AP 的严重程度有关,炎症越重,其表达越高。

关键词:胰腺炎;类固醇受体辅活化子-3;基因转录;蛋白质表达;病情严重程度

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.15.024

中图分类号:R657.51;R446.61

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)15-1995-03

Expression and significance of steroid receptor coactivator-3 in the acute pancreatitis

LI Jia¹, LI Ying², YIN Yang-guang¹, et al.

(1. Emergency Department; 2. Department of Cardiovascular Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the expression and significance of steroid receptor coactivator-3(SRC-3) in polymorph nuclear neutrophils during patients with acute pancreatitis. **Methods** RT-PCR and Western blotting were used to detect mRNA levels and the protein expression of SRC-3 in blood from the patients with severe acute pancreatitis(SAP), mild acute pancreatitis(MAP) and normal control people(NC). **Results** RT-PCR and Western blotting analysis showed that there were significant difference of SRC-3 expression in blood from SAP, MAP and NC group both in mRNA level($P < 0.01$) and protein level($P < 0.01$), and were gradually decreased. **Conclusion** The expression of SRC-3 closely correlates with the severity of the disease. SRC-3 expresses more while the inflammation is more serious.

Key words: pancreatitis; steroid receptor coactivator-3; genetic transcription; protein expression; severity of pathogenetic condition

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床上常见的急腹症,大多数为轻症急性胰腺炎(mild acute pancreatitis, MAP),但少部分的胰腺炎发展成重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP),引起全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),并逐渐发展为多器官功能不全综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS),病死率高。SAP 术后患者生理及心理健康评分均较正常对照组低,远期生存质量较差^[1]。有研究发现,类固醇受体辅活化子-3(steroid receptor coactivator-3, SRC-3)作为类固醇受体辅活化子家族成员,除与乳腺癌^[2]、卵巢癌^[3]等肿瘤的发生、转移相关外,与烧伤小鼠模型中的炎症因子的调控也有关系^[4],而 SRC-3 在 AP 的表达及机制尚不清楚。本实验从 mRNA 水平及蛋白水平检测 SRC-3 在 AP 患者血清中的表达,旨在探讨其在 AP 临床诊断和治疗中的价值。

1 临床资料

1.1 一般资料 收集本院急诊科 2009 年 6 月至 2010 年 1 月住院的 AP 患者 39 例,其中 SAP 组 18 例,男 10 例,女 8 例;年龄 30~58 岁,平均(46.35±14.24)岁。MAP 组 21 例,男 13 例,女 8 例;年龄 39~74 岁,平均(52.75±15.74)岁。正常对照(NC)组 15 例,为正常志愿者,男 7 例,女 8 例;年龄 22~60 岁,平均(35.58±11.57)岁。各组在年龄、性别构成方面比较,差异均无统计学意义。

1.2 诊断标准 AP 诊断均符合中国 AP 诊治指南^[5]。不包括由胰腺肿瘤、手术、创伤、妊娠等引起的胰腺炎患者及 48 h 内死亡的暴发性胰腺炎患者。入院后患者均给予 AP 常规治疗。

1.3 实验方法及检测指标

1.3.1 提取单核细胞 NC 组于检测日清晨, SAP、MAP 组于诊断明确后 24 h 内空腹采集静脉血 40 mL,分置于含肝素液的干燥抗凝管内,摇匀待分离。每管加入 6%葡聚糖生理盐水 10 mL,37℃水浴中静置 60 min。将淋巴细胞分离液平衡至室温,抽取其中 20 mL 加入另一 50 mL 离心管 A 内。吸取抗凝血上层缓慢加入淋巴细胞分离液中,静置 5 min;20℃、2 000 r/min(离心半径 3 cm)离心 20 min。当溶液分 4 层时,弃去第 1 层和第 2 层,加入等体积红细胞裂解液(NHCl 8.29 g, KHCO₃ 1 g, EDTA 0.37 g, 加 ddH₂O 至 1 L,新鲜配置)混匀,冰上裂解 15 min;4℃、1 000 r/min(离心半径 3 cm)离心 10 min。见管底有沉淀后再次加入等体积红细胞裂解液,混匀,冰上裂解 10 min;4℃、1 000 r/min(离心半径 3 cm)离心 10 min,去上清液。以磷酸盐缓冲液(PBS)10 mL 洗涤细胞沉淀,4℃、1 000 r/min(离心半径 3 cm)离心 5 min,2 次。收集适量细胞进行以下实验。

1.3.2 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 SRC-3 mRNA 水平取 5×10^7 个细胞,采用小量柱离心式总 RNA 抽提试剂盒

△ 通讯作者,电话:13228685385;E-mail:xinqiaosz1106@sina.com。

(上海华舜生物工程有限公司),按试剂盒说明书抽提上述细胞 RNA,最后用 DEPC 处理水溶解 RNA。提取的总 RNA 经紫外分光光度计测定提取物浓度,A260/A280 比值在 1.8~2.0。运用 PrimeScript™ RT-PCR 试剂盒(TaKaRa)合成样本 cDNA,4 °C 保存备用。

SRC-3 上游引物:5'-TGT TTC CGT CTC GAT TCA CCA-3',下游引物:5'-GAT TAG GAG AAA ACT TGG ATC C-3',扩增产物长度为 392 bp, β -actin 上游引物:5'-GCT GTC CCT GTA TGC CCT CT-3',下游引物:5'-TTG ATG TCA CGC ACG ATT T-3',扩增产物长度为 222 bp。

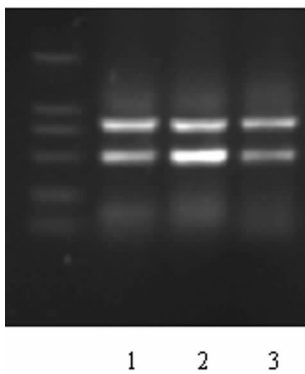
SRC-3 基因及 β -actin 基因 PCR 引物由上海生物工程公司合成。反应体系:反应体积为 50 μ L,cDNA 5 μ L,引物浓度 0.1 nmol/L,taq 酶 2.5 u。反应条件:94 °C 预变性 1 min,94 °C 变性 30 s,57 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。反应产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,经紫外凝胶成像系统分析目的片段扩增带和 β -actin 扩增带,用两者灰度比值表示 SRC-3 mRNA 相对含量。不同组之间 RT-PCR 实验均重复 5 次。

1.3.3 Western blot 检测 SRC-3 蛋白表达水平 上述细胞提取物分别于 4 °C 低温离心 12 000 r/min(离心半径 3 cm)离心 30 min,吸取上清液至 Eppendorf 管中,蛋白定量应用 Bradford 法,8% SDS-PAGE 电泳分离等量样品裂解液,转膜在 PVDF 膜上进行,电转 1 h(250 mA),将含 5% 脱脂奶的 PBST 封闭滤膜 1 h,加入一抗(兔抗 SRC-3 多克隆抗体作为一抗,工作浓度为 1:50),4 °C 孵育过夜,辣根过氧化物酶耦联的二抗,孵育 1 h,PBST 洗涤 3 次,ECL 化学发光自显影,用凝胶成像系统进行分析。不同组之间 Western blot 实验均重复 5 次。

1.4 统计学方法 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 统计软件处理,采用成组设计的方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SRC-3 mRNA 表达水平 SAP 组、MAP 组、NC 组的 RT-PCR 产物在 392 bp 左右出现特异条带,与 SRC-3 片段大小相符,即在 3 组中均有表达,其半定量结果分别为 1.159 \pm 0.049、0.785 \pm 0.128、0.355 \pm 0.076。SAP 组表达高于 MAP 组,NC 组表达量相对较低,差异有统计学意义,见图 1、2。

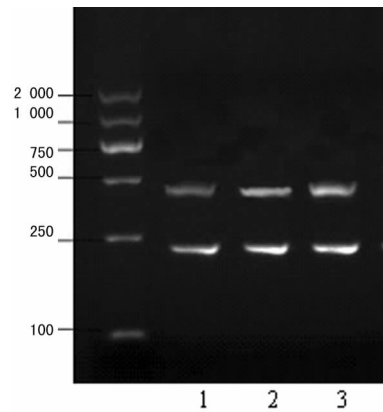


1: SAP组; 2: MAP组; 3: NC组。

图1 RNA 变性凝胶电泳结果

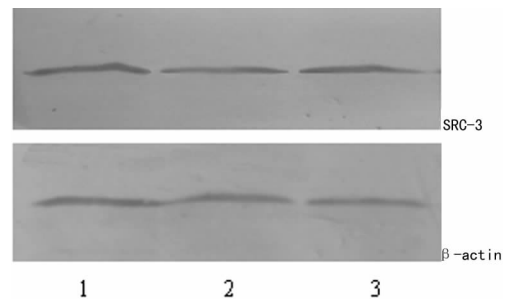
2.2 SRC-3 蛋白表达水平 SRC-3 在 SAP 组、MAP 组、NC 组均有表达,其半定量结果分别为 2.125 \pm 0.067、1.474 \pm 0.275、0.778 \pm 0.085, SAP 组高于 MAP 组,差异有统计学意义

($P < 0.05$),见图 3。



1: NC组; 2: MAP组; 3: SAP组。

图2 SRC-3 mRNA 的表达



1: SAP组; 2: MAP组; 3: NC组。

图3 SRC-3 蛋白的表达

3 讨论

SRC-3 又称为 NCOA3、RAC3、P/CIP、AIB1,最早是在寻找乳腺癌中频繁扩增的基因时发现的,是 P160 类固醇受体辅活化子家族成员之一,SRC 基因编码相对分子质量为 160×10^3 的辅活化子,此家族还包括 SRC-1 和 SRC-2。近年来发现它与恶性肿瘤密切相关,SRC-3 除了在多种激素依赖性肿瘤,如乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌^[6]、子宫内膜癌^[7]等中有过量表达外,还发现其在一些非激素依赖性肿瘤,如食管癌^[8]、鼻咽癌^[9]、膀胱癌^[10]等实体肿瘤中过量表达,且与肿瘤的复发与转移有密切关系,而在对应正常组织、良性肿瘤或增殖性病变中呈不表达或表达较弱。因此有学者认为 SRC-3 可作为肿瘤诊断的检测指标之一。近年来研究发现 SRC-3 可作为受体蛋白聚集其他的辅活化子和基本转录结构到启动子上,调节多个重要信号通路,如胰岛素样生长因子 IGF-1/Akt 通路^[10-11]和核因子- κ B(NF- κ B)^[12]途径等,从而调控一系列细胞过程,包括细胞生长、存活及迁移等,故 SRC-3 浓度和活性变化明显影响许多基因的表达,从而调控一系列细胞过程。

在 NF- κ B 信号通路过程中,SRC-3 主要通过影响 NF- κ B 的阻遏亚单位(I κ B)被 I κ B 激酶(IKK)磷酸化的过程来活化 NF- κ B^[13]。SRC-3 与 IKK 结合后磷酸化 I κ B,使其降解并释放 NF- κ B,使 NF- κ B 入核后活化,从而增强 NF- κ B 介导的基因表达。目前研究表明,NF- κ B 活化后能上调各种细胞因子和炎症介质,如 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等的表达^[14],另外许多与中性粒细胞黏附和聚集相关的受体表达,如 ICAM-1 等也都通过 NF- κ B 途径激活。

本研究表明,SRC-3 在基因水平和蛋白水平上 SAP 组患者明显高于 MAP 组及 NC 组,表明 SRC-3 可能对细菌感染后

机体的炎症反应有重要的调控作用,因此认为 SRC-3 能在一定程度上反应炎症严重程度,可作为判断病情严重程度和病情预后的指标之一,但其具体的调控途径和机制尚有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 刘红. 急性胰腺炎术后远期生存质量评价[J]. 安徽医药, 2009, 13(7): 855.
- [2] Zhao W, Zhang Q, Kang X, et al. AIB1 is required for the acquisition of epithelial growth factor receptor-mediated tamoxifen resistance in breast cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 380(3): 699.
- [3] 韩肖燕, 陈悦, 侯敏敏, 等. 卵巢上皮性交界性肿瘤中 AIB1 蛋白的表达及意义[J]. *中华妇幼临床医学杂志*, 2008, 6(4): 17.
- [4] 李军, 粟永萍, 王军平, 等. 烧伤后小鼠类固醇受体辅活化子的表达变化[J]. *创伤外科杂志*, 2007, 9(3): 264.
- [5] Chart WM, Lai TY, Lai RY, et al. Half-Dose verteporfin photodynamic therapy for acute central serous chorioretinopathy one-year result of a randomized controlled trial [J]. *Ophthalmology*, 2008, 115(10): 1756.
- [6] Yan J, Erdem H, Li R, et al. Steroid receptor coactivator-3/AIB1 promotes cell migration and invasiveness through focal adhesion turnover and matrix metalloproteinase expression[J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 5460.
- [7] Sakaguchi H, Fujimoto J, Sun WS, et al. Clinical implications of steroidreceptor coactivator(SRC)-3 in uterine endometrial cancers[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007, 104: 237.
- [8] Xu FP, Xie D, Wen JM, et al. SRC-3/AIB1 protein and gene amplification levels in human esophageal squamous cell carcinomas[J]. *Cancer Lett*, 2007, 245: 69.
- [9] Liu MZ, Xie D, Mai SJ, et al. Overexpression of AIB1 in nasopharyngeal carcinomas correlates closely with advanced tumor stage[J]. *Am J Clin Pathol*, 2008, 129: 728.
- [10] Luo JH, Xie D, Liu MZ, et al. Protein expression and amplification of AIB1 in human urothelial carcinoma of the bladder and overexpression of AIB1 is a new independent prognostic marker of patient survival [J]. *Int Cancer*, 2008, 122: 2554.
- [11] Rui L, Yan C, Ling-lan Z, et al. Gambogic acid induces G0/G1 arrest and apoptosis involving inhibition of SRC-3 and inactivation of Akt pathway in K562 leukemia cells [J]. *Toxicology*, 2009, 262: 98.
- [12] Gao Z, Chiao P, Zhang X, et al. coactivator and corepressors of NF-kappaB in IkappaB alpha gene promoter[J]. *Biol Chem*, 2005, 280: 21091.
- [13] Li C, Yao YL, Xin HF, et al. Essential phosphatases and a phospho-degron are critical for regulation of SRC-3/AIB1 coactivator function and turnover [J]. *Molecular Cell*, 2008, 31(6): 835.
- [14] 黄小兵, 梁平. NF-κB 在感染和炎症促进肿瘤发生及发展中的作用[J]. *重庆医学*, 2008, 37(23): 2741.

(收稿日期: 2010-02-25 修回日期: 2010-04-25)

(上接第 1994 页)

参考文献:

- [1] Gloor B, Muller CA, Worni M, et al. Late mortality in patients with severe acute pancreatitis[J]. *Br Surg*, 2001, 88: 975.
- [2] Vege SS, Chari ST, Petersen BT, et al. Endoscopic retrograde cholangio pancreatography—induced severe acute pancreatitis[J]. *Pancreatology*, 2006, 6: 527.
- [3] Gullo L, Migliori M, Olah A, et al. Acute pancreatitis in five European countries: etiology and mortality[J]. *Pancreas*, 2002, 24: 223.
- [4] 巫协宁. 重症胰腺炎的规范化治疗和治疗策略[J]. *中华消化杂志*, 2001, 21(5): 300.
- [5] 王兴鹏, 许国铭, 袁耀琼, 等. 中国急性胰腺炎诊治指南(草案)[J]. *中华内科杂志*, 2004, 43(3): 236.
- [6] 王家良, 刘鸣. 循证医学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 177.
- [7] Egger M, Smith GD, Altman DG. *Systematic Reviews in Health Care*[M]. 2th ed. London: Tavistock Square, 2001: 73.
- [8] Jadad AR, Moore A, Carrol D, et al. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: Is blinding necessary[J]. *Control Clin Trials*, 1996, 17: 1.
- [9] 彭燕, 王忠琼, 李云, 等. 柴芍承气汤对重症急性胰腺炎并发肠麻痹的治疗作用[J]. *四川医学*, 2003, 24(6): 571.
- [10] 王超, 周喜汉, 尹毅霞, 等. 柴芍承气汤综合治疗重症急性胰腺炎并胃肠功能衰竭临床疗效观察[J]. *右江医学*, 2007, 35(3): 240.
- [11] 吕春艳, 李莉, 张春艳, 等. 多蒙特联合柴芍承气汤治疗重症胰腺炎的临床观察[J]. *中国误诊学杂志*, 2007, 7(30): 7237.
- [12] 汤华伦. 急性重症胰腺炎的中西医结合非手术治疗[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2006, 12(2): 86.
- [13] 王国品, 腾晓琨, 杨莉, 等. 柴芍承气汤对重症急性胰腺炎及其并发症的作用[J]. *中国厂矿医学*, 2006, 19(2): 100.
- [14] 何俊, 何庆玲, 陈忠华, 等. 生长抑素联合柴芍承气汤鼻饲和生大黄灌肠治疗重症急性胰腺炎 50 例分析[J]. *重庆医学*, 2008, 37(22): 2603.
- [15] 樊宏伟, 丁小琳. 生长抑素联合元胡柴芍承气汤治疗重症胰腺炎的临床研究[J]. *胰腺病学*, 2005, 5(1): 33.
- [16] 尹燕华. 中西医结合治疗急性重症胰腺炎的疗效观察[J]. *现代中西医结合杂志*, 2008, 17(3): 3624.
- [17] 唐毅, 陈拥军, 姚勇, 等. 中西医结合治疗重症胰腺炎疗效观察[J]. *重庆医学*, 2003, 32(12): 1732.

(收稿日期: 2009-12-18 修回日期: 2010-01-09)